

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10744

研究課題名(和文) 虚血性心不全に対するヒト脂肪由来幹細胞を用いた細胞治療

研究課題名(英文) Treatment of ischemic heart failure using human adipose-derived stem cells

研究代表者

勝間田 敬弘 (Katsumata, Takahiro)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：60224474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：心臓血管手術時に大動脈基部の脂肪および皮下脂肪を採取し、心臓周囲脂肪組織由来AdSC(CA-AdSC)と皮下脂肪組織由来AdSC(SC-AdSC)を分離し、その性質の比較を行なった。脂肪細胞から分離できる単核球細胞数は有意に皮下脂肪細胞が多かったが、そのうちAdSCとして培養できる細胞数は有意に心臓周囲脂肪由来組織で高かった。CA-AdSCおよびSC-AdSC性質を比較すると増殖能、遊走能、抗アポトーシス能はCA-AdSCで有意に高かった。心筋梗塞モデルマウスにCA-AdSCおよびSC-AdSCを移植し、心臓超音波検査を用いた心機能の推移の比較、右心カテーテル検査、病理学的検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心筋症は慢性心不全の原因となり生活の質を著しく低下させている。虚血部位に対する細胞治療は、移植された細胞が血管新生や血管再生を促し組織血流が増加することによって機能を回復させることができると考えられている。脂肪組織から分離培養した幹細胞(AdSC)は、多系統への分化能を有することが明らかになっている。心臓周囲脂肪組織由来AdSCと皮下脂肪組織由来AdSCの性質の調査をおこなった。

研究成果の概要(英文)：The base of aortic adipose tissue and subcutaneous adipose tissue were collected in cardiovascular surgery, and the base of aortic adipose tissue (CA-AdSC) and AdSC derived from subcutaneous adipose tissue (SC-AdSC) were separated and their properties were compared. The number of mononuclear cells that could be separated from adipocytes was significantly higher in subcutaneous adipocytes, but the number of cells that could be cultured as AdSCs was significantly higher in pericardial adipose-derived tissues. Comparing CA-AdSC and SC-AdSC properties, CA-AdSC showed significantly higher proliferative ability, migration ability, and anti-apoptotic ability. We have transplanted CA-AdSC and SC-AdSC into myocardial infarction model mouse, and are conducting a comparison of changes in cardiac function using echocardiography, right heart catheterization, and pathological examination.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞は再灌流治療の開発によって生命予後が改善したが、陳急性心筋梗塞や狭心症による虚血性心筋症は慢性心不全となり生活の質を著しく低下させている。虚血傷害を受けた心筋細胞は再灌流治療のみでは機能を回復させることができないだけでなく、再灌流により新規に傷害を受け、炎症が惹起され、線維芽細胞の増生等により心機能は低下する。細胞移植療法は、虚血に陥った組織に幹細胞を移植することで機能を回復させようとするものである。現在、限られた施設ではあるが、重症虚血肢の新規治療法として末梢血単核球細胞を虚血肢に移植(注射)する治療法が行われており、救肢による生命予後の改善と生活の質の改善が得られるようになった。このように、虚血部位に対する細胞治療は、移植された細胞が血管新生や血管再生を促し組織血流が増加することによって機能を回復させることができると考えられている。虚血性心筋症においても、従来の再灌流療法に細胞移植療法(再生医療)を組み合わせることが必要である。細胞源としては、これまで骨髄間質系幹細胞、末梢血間質系幹細胞、末梢血単核球細胞が用いられてきたが、脂肪組織から分離培養した幹細胞(AdSC)は、脂肪細胞のみならず多系統への分化能を有することが明らかになっており、ラットやマウスの心筋梗塞モデル動物において AdSC 移植による著明な心機能改善効果が報告されている。AdSC は自家細胞であるため、胚性幹(ES)細胞移植や他家臓器移植治療と異なり倫理面や拒絶反応などの問題が回避できる。さらに、脂肪組織からの AdSC の分離は、密度勾配法を用いる必要がなくベッドサイドで分離装置を用いて簡便に行え、脂肪組織採取と細胞移植を一度に行える。脂肪組織は全身の至る所にあり、瘦身目的で吸引廃棄することもあるほど不要な組織と考えられているが、白色脂肪と違い褐色脂肪は体温上昇に寄与するなどの機能を有しており、部位によって細胞機能が異なることが示唆される。虚血性心疾患や心不全に対する細胞治療法を確立することは、超高齢社会に向かっている我が国において、患者の Quality of Life を向上させるだけでなく、今後の医療費高騰による社会保障費の圧迫を軽減することも期待できる。

2. 研究の目的

これまでの研究で、脂肪組織由来間葉系幹細胞は、脂肪・骨・骨格筋・心筋・血管・膵臓・肝臓・神経などを構築する多系統の細胞への分化能を持つことが知られ、組織再生治療の細胞ソースとして臨床応用が期待されている。これまでに、マウスの種々の脂肪組織を採取し分離培養した AdSC の性質を調べたところ、心臓周囲脂肪組織から分離した AdSC は、他の

組織由来の AdSC に比べて有意に高い細胞密度を示し、さらに心臓周囲脂肪由来 AdSC は他の部位由来の AdSC に比べて、血管内皮細胞マーカーである CD31 陽性率が高かった。また、心筋細胞マーカーの心臓トロポニン (cTN-T) の陽性率は、心臓周囲組織由来 AdSC で高かった。これらの結果から、心臓周囲組織由来 AdSC は他の脂肪組織に比べて心筋細胞への分化向性が高く血管新生に優れている可能性が示唆された。哺乳動物モデルを用いて心臓周囲組織由来 AdSC の治療効果を検討したところ、ラットの心臓周囲脂肪組織から分離培養した AdSC を心筋梗塞部位に移植した群で有意に心機能改善効果を認めた。これらの結果から、ヒトにおいても心臓周囲脂肪から分離した AdSC は虚血性心疾患治療に用いる細胞ソースとして適しているのではないかと推測される。

本研究では、心臓血管外科で行っている冠動脈バイパス術や上行大動脈手術、大動脈弁手術時に、通常は切除廃棄する大動脈基部の心臓周囲脂肪組織由来 AdSC (hcAdSC) の性質を調べることを目的とした。hcAdSC の分化能や増殖率を調べ、皮下脂肪組織由来 AdSC との差異や基礎疾患、内服薬等の及ぼす影響を検討することで、心臓疾患患者における再生治療に使用可能な細胞ソースについて新たな知見を得る。

3 . 研究の方法

大阪医科大学研究倫理委員会で承認を得た後、大阪医科大学附属病院 心臓血管外科で手術を受ける患者のうち、冠動脈バイパス術、上行大動脈置換術、大動脈弁置換術で大動脈基部周囲脂肪を切除する症例を対象とし、このうちインフォームドコンセントの得られた患者から、手術時に大動脈基部心臓周囲脂肪組織と皮下脂肪組織を各々0.5 cm³採取した。匿名化の後、コラゲナーゼを用いて組織から細胞を採取し、細胞外マトリクスでコーティングした培養皿で AdSC を分離培養した。3 継代まで培養の後、細胞は凍結保存した。患者背景として基礎疾患、高血圧の有無、心筋梗塞の既往、脂質異常症の有無、体表面積、性別、年齢、血液検査で血清クレアチニン値、肝酵素、BNP 値、服薬内容を調べた。細胞の増殖速度、生存率、第 3 継代時の細胞数を調べた。

第 3 継代時のヒト心臓周囲脂肪由来幹細胞 (CA-AdSC) とヒト皮下脂肪由来幹細胞 (SC-AdSC) を用いてそれぞれの、FACS、抗アポトーシス能、増殖・細胞活性能、遊走能の評価を行った。

Nude Mouse (Balb/c background 6W)48 匹を用いて、心筋再灌流モデルを作成し、細胞

移植実験を行った。Medetomine, Midazolam, butorphanol で麻酔を行い、経口挿管下に開胸を行い、左心耳より 2mm 末梢の前下行枝を 15 分結紮し、心電図で ST の上昇を確認した後に、結紮を解除し閉胸を行った。術後 3 日目に覚醒下に心エコー検査で心機能評価を行い、尾静脈より CA-AdSC、SC-AdSC の細胞懸濁液 (1.0×10^4 個、250 μ L) を静注した。術後 30 日目に心エコー検査および心臓カテーテル検査で心機能を評価した。さらに心臓の病理標本を作製し、病理学的変化を検討した。

4 . 研究成果

大動脈基部脂肪を切除する必要がある大動脈弁置換術、冠動脈バイパス術、上行大動脈置換術をおこなった 32 人の患者から心臓周囲脂肪および皮下脂肪を採取した (患者内訳 : 大動脈弁置換術 6 例、冠動脈バイパス術 24 例、冠動脈バイパス術と大動脈弁置換術同時施行 2 例)。既往歴は、高血圧症 29 例、糖尿病 15 例 (うちインスリン使用 3 例)、高脂血症 14 例 (うちスタチン内服 8 例) であった。このうち、心臓周囲と皮下脂肪由来細胞共に感染なく第 3 継代まで培養を継続できたのは 8 例であった。8 例の内訳は、男性 7 名、女性 1 名、施行手術は冠動脈バイパス術 7 例、大動脈弁置換術 1 例、年齢は 53 歳から 77 歳 (中央値 73 歳) であった。採取した脂肪組織重量は、心臓周囲 0.44g - 1.4g (平均 0.84g)、皮下脂肪 0.58-1.01 g (平均 0.77g)、それぞれの組織 1 g から分離できた単核球細胞数は心臓周囲脂肪 1.6×10^6 - 19.1×10^6 (平均 8.9×10^6)、皮下脂肪 6.2 - 49.7×10^6 (平均 25.8×10^6) であった。それらのうち AdSC として培養できた細胞は、心臓周囲脂肪由来 平均 26.5%、皮下脂肪由来 平均 9.7% であった。脂肪細胞から分離できる単核球細胞数は有意に皮下脂肪細胞が多かったが、そのうち AdSC として培養できる細胞数は有意に心臓周囲脂肪由来組織で高かった。増殖能、遊走能、抗アポトーシス能は CA-AdSC で有意に高かった。心筋虚血再灌流モデルに対する AdSC の投与実験では、CA-AdSC と SC-AdSC の比較においては左心機能の有意な変化は認めなかった。病理学的評価は、検討中である。現在、この心臓周囲脂肪組織由来 AdSC の細胞治療効果を確認する研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊井 正明 (Ii Masaaki) (10442922)	大阪医科大学・研究支援センター・講師 (34401)	
研究分担者	神吉 佐智子 (Kanki Sachiko) (40411350)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	
研究分担者	打田 裕明 (Uchida Hiroaki) (70736834)	大阪医科大学・医学部・助教 (34401)	